

УДК 616-006.66-092.4

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2025-2-36-43>

ДНК-содержащие экстраклеточные структуры опухолевых клеток подавляют формирование нейтрофильных экстраклеточных ловушек *in vitro*

Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И., Ким А.Э.,
Чахалян А.Г., Турищева О.О.

Российский национальный исследовательский медицинский университет (РНИМУ)

им. Н.И. Пирогова

Россия, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1

РЕЗЮМЕ

Цель. Исследование параметров формируемых ДНК-содержащих экстраклеточных структур при совместном культивировании нейтрофилов здоровых доноров, клеток аденокарциномы HCT116 и миелобластомы K562.

Материалы и методы. Осаждение эритроцитов в крови, обработанной ЭДТА, проводили, используя декстран 500. Слой плазмы крови, обогащенный нейтрофилами, отбирали. Примеси мононуклеарных клеток составляли менее 1%. С помощью дифференциального центрифугирования освобождались от тромбоцитов. Выделенные нейтрофилы в среде RPMI-1640 использовали в экспериментах по кратковременному культивированию. Клетки аденокарциномы HCT116 и миелобластомы K562 были получены из American Type Culture Collection. В экспериментах проводили совместное культивирование нейтрофилов доноров и опухолевых клеток в течение 3 ч. Для визуализации формируемых ДНК-содержащих внеклеточных структур клетками, культивированными на среде RPMI-1640, использовали флуоресцентную микроскопию с красителем SYBR Green.

Результаты. Нейтрофилы распознают опухолевые клетки и реагируют на контактные взаимодействия, формируя нейтрофильные экстраклеточные ловушки в форме нейтрофильных сетей. Контакты с клетками аденокарциномы HCT116 вызывают быстрое формирование нейтрофильных сетей – в течение 1 ч. Раскрытие нейтрофильных сетей, индуцированное контактами с клетками миелобластомы K562, требует более продолжительной инкубации – в течение 2 ч. Клетки HCT116 формируют пучки ДНК-содержащих волокон значительного размера, которые полностью ингибируют формирование нейтрофильных сетей. Клетки K562 подавляют нейтрофильные защитные реакции, уменьшая количество и размеры нейтрофильных сетей. Эффект ингибирования нейтрофильных сетей со стороны клеток K562 обусловлен, вероятно, действием растворимого фактора, подавляющего функции нейтрофилов, описанного ранее.

Заключение. Исследование показывает, что обе клеточные линии опухолевых клеток способны подавлять реакции клеток врожденного иммунитета с помощью различных механизмов. Клетки аденокарциномы ингибируют формирование нейтрофильных сетей при непосредственных контактах за счет продуцируемых ДНК-содержащих волокон значительного размера. Клетки миелобластомы вызывают тот же эффект действия, вероятно, путем секреции гуморальных факторов.

Ключевые слова: HCT116, K562, НЭЛ, ДНК-содержащие волокна, онкология, патофизиология

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н.И. Пирогова (протокол № 239 от 15.04.2024).

Для цитирования: Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И., Ким А.Э., Чахалян А.Г., Турищева О.О. ДНК-содержащие экстраклеточные структуры опухолевых клеток подавляют формирование нейтрофильных экстраклеточных ловушек *in vitro*. *Бюллетень сибирской медицины*. 2025;24(2):36–43. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2025-2-36-43>.

DNA-Containing Extracellular Structures of Tumor Cells Inhibit the Formation of Neutrophil Extracellular Traps in Vitro

Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Panina M.I., Kim A.E., Chakhalian A.G., Turishcheva O.O.

*Pirogov Russian National Research Medical University
1 Ostrovityanova St., 117997 Moscow, Russian Federation*

ABSTRACT

Aim. To study the parameters of formed DNA-containing extracellular structures during co-cultivation of neutrophils from healthy donors, HCT116 adenocarcinoma cells and K562 myeloblastoma.

Materials and methods. Erythrocyte sedimentation in EDTA-treated blood was carried out using Dextran 500. The neutrophil-enriched layer of blood plasma was collected. The admixture of mononuclear cells was less than 1%. Platelets were removed using differential centrifugation. Isolated neutrophils in RPMI-1640 medium were used in short-term culture experiments. HCT116 adenocarcinoma and K562 myeloblastoma cells were obtained from the American Type Culture Collection. In the experiments, donor neutrophils and tumor cells were co-cultivated for 3 hours. SYBR Green fluorescence microscopy was used to visualize the DNA-containing extracellular structures formation by cells cultured in RPMI-1640 medium.

Results. Neutrophils recognize tumor cells and respond to contact interactions, forming neutrophil extracellular traps in the form of neutrophil networks. Contacts with HCT116 adenocarcinoma cells cause rapid formation of neutrophil web-like structures – within 1 hour. The opening of neutrophil web-like structures induced by contacts with K562 myeloblastoma cells requires a longer incubation (2 hours). HCT116 cells form large bundles of DNA-containing fibers, which completely inhibit the formation of neutrophil networks. K562 cells suppress neutrophil defense responses by reducing the number and size of neutrophil networks. The effect of inhibition of neutrophil networks by K562 cells is probably due to the action of a soluble factor that suppresses neutrophil functions described earlier.

Conclusion. The study shows that both tumor cell lines are capable of suppressing innate immune cell responses through different mechanisms. Adenocarcinoma cells inhibit neutrophil network formation upon direct contact due to the large size DNA-containing fibers they produce. Myeloblastoma cells produce the same effect, probably acting by secreting humoral factors.

Keywords: HCT116, K562, NETs, DNA-containing fibers, oncology, pathophysiology

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest associated with the publication of this article.

Source of financing. The authors state that they received no funding for the study.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the Ethics Committee of Pirogov Russian National Research Medical University (Minutes No. 239 dated April 15, 2024).

For citation: Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Panina M.I., Kim A.E., Chakhalian A.G., Turishcheva O.O. DNA-containing extracellular structures of tumor cells inhibit the formation of neutrophil extracellular traps *in vitro*. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2025;24(2):36–43. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2025-2-36-43>.

ВВЕДЕНИЕ

Одно из основных положений современной онкоиммунологической концепции, описывающее взаимодействие клеток опухоли и нейтрофилов, заключается в том, что нейтрофилы, формирующие нейтрофильные экстраклеточные ловушки (НЭЛ, NETs), способны вызывать рецидив опухоли и метастазирование [1, 2]. Предполагают, что NETs могут захватывать циркулирующие раковые клетки и способствовать их распространению. Кроме того, сообщалось, что они (НЭЛ, NETs) «пробуждают» спящие раковые клетки, запуская рецидивирование опухоли и метастазирование. Поэтому вполне естественно исследователи предлагают ингибировать формирование нейтрофильных экстраклеточных ловушек для предотвращения роста опухоли [3].

Причину активации роста опухолевых клеток также видят в негативном влиянии опухоль-ассоциированных фибробластов, которые способны поддерживать онкогенез. Авторы признают, что препятствием для внедрения инновационных методов лечения опухолевых заболеваний является недостаточность знаний об опухолевом микроокружении (Tumor Microenvironment, TME).

Многие исследователи отмечают, что и нейтрофильные экстраклеточные ловушки, и опухоль-ассоциированные фибробласты как клеточные факторы опухолевого микроокружения изучены недостаточно [4, 5]. Сложный состав компонентов опухолевого микроокружения (гуморальные и клеточные компоненты) создает среду, необходимую для роста, пролиферации, фенотипической гибкости и вариабельности опухолевых клеток, но при этом жесткую и иммуносупрессивную для организма, с дефицитом питательных веществ [6]. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки, возможно, участвуют в процессе канцерогенеза и прогрессирования рака, однако, до сих пор трудно решить, играет ли нетоз про- или противоопухолевую роль [7]. Вместе с тем некоторые исследователи в последнее время отмечают двойственную природу эффектов НЭЛ в контексте противоопухолевых методов лечения, изучая их потенциал либо нейтрализовать, либо даже улучшать результаты лечения [8]. Также считают, что НЭЛ играют ключевую роль в формировании позитивной реакции на химиотерапию и обладают значительным потенциалом для повышения эффективности лечения [9].

Уточнение роли нейтрофилов и формируемых ими нейтрофильных экстраклеточных ловушек в канцерогенезе возможно только при прямых исследованиях взаимодействия клеток опухоли и клеток

системы врожденного иммунитета. Следует заметить, что подобные работы единичны, и это обстоятельство определяет актуальность настоящего исследования.

Цель – исследование параметров формируемых ДНК-содержащих экстраклеточных структур при совместном культивировании нейтрофилов здоровых доноров, клеток аденокарциномы HCT116 и миелобластомы K562.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение клеточных фракций нейтрофилов здоровых доноров, клетки аденокарциномы и миелобластомы K562

Выделение нейтрофилов с целью исследования развивающихся в организме пациента клеточных реакций требует исключения воздействия на эти клетки химических или механических раздражителей *in vitro*, поэтому стандартные методы выделения в градиенте плотности фиколла малопригодны.

Выделение нейтрофилов из венозной крови волонтеров, обработанной ЭДТА, проводили, используя декстран 500. Для этого к 10 мл периферической крови добавляли 1 мл 10%-го раствора декстрана 500 (Fluka), приготовленного на натрий-фосфатном буферном растворе (50 мМ, pH 7,4), и осторожно перемешивали. После осаждения эритроцитов в течение 30 мин при 37 °C отбирали слой плазмы крови (200 мкл), вплотную примыкающий (на расстоянии 1 мм) к слою эритроцитов.

Плазма крови из этого слоя содержит только нейтрофилы, тромбоциты и небольшое количество эритроцитов. Примеси мононуклеарных клеток составляют менее 1%. Для освобождения от тромбоцитов к 200 мкл плазмы крови, содержащей нейтрофилы, добавляли 10 мл 50 мМ натрий-фосфатного буферного раствора, pH 7,4, и осаждали, центрифугируя при 1 200 об/мин (400 g), 15 мин. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в 1 мл среды RPMI-1640. Выделенные нейтрофилы в среде RPMI-1640 использовали в экспериментах по кратковременному культивированию. Жизнеспособность выделенных нейтрофилов составляла не менее 95% (тест с 0,1%-м раствором трипанового синего).

Клеточная линия аденокарциномы толстой кишки человека HCT116 была получена из American Type Culture Collection (Манассас, штат Вирджиния). Клетки миелобластомы K562 получены из лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина.

Культивирование клеток

Все исследуемые клетки в среде RPMI-1640 инкубировали в атмосфере 5%-го CO_2 при 37 °C во всех экспериментах в течение 3 ч. Конечная концентрация клеток в среде культивирования составляла 2×10^5 клеток/мл.

В часть проб, для активации нейтрофилов здоровых доноров и приобретения ими способности формировать нейтрофильные экстраклеточные ловушки, добавляли липополисахариды (ЛПС, LPS) (*Klebsiella pneumoniae*, Sigma, Япония), 25 мкг/мл. Этот прием позволяет получить нейтрофильные ловушки в характерной морфологической форме – в виде нейтрофильных сетей. Из четырех главных морфологических структур нейтрофильных экстраклеточных ловушек (сети, одиночные нити, волокна и вуали) [10] функциональной активностью обладает только одна – сетевидная [11].

Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток, формирующих внеклеточные ДНК-содержащие структуры

Для визуализации и определения параметров (количества и размеров) внеклеточных ДНК-содержащих структур исследуемых клеток (нейтрофилов здоровых доноров, клеток аденокарциномы НСТ116 и миелобластомы K562) использовали флуоресцентную микроскопию [12]. Результаты выражали в процентах в виде отношения количества ДНК-содержащих экстраклеточных структур к общему числу клеток в поле зрения. Для определения размеров ДНК-содержащих экстраклеточных структур использовали окуляр-микрометр. Выявление внеклеточных ДНК-содержащих структур осуществляли с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green (Evrogen, Россия), специфично взаимодействующего с двухцепочечной ДНК. Микроскопирование, подсчет и фоторегистрацию клеток и экстраклеточных структур проводили при $\times 1\,000$.

Полученные результаты обрабатывали в программе Statistica 12.0 (StatSoft Inc., США). Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$). Сравнение количественных признаков проводили по результатам *t*-теста Стьюдента и дисперсионного анализа. Различия считали статистически значимыми при значениях $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наблюдения за поведением клеток нейтрофилов здоровых доноров, клеток аденокарциномы НСТ116 и миелобластомы K562 при их кратковременном совместном культивировании в различных комбинаци-

ях в течение 3 ч показывает активное формирование этими клетками ДНК-содержащих экстраклеточных структур. Определение параметров (количества и размеров) этих ДНК-содержащих экстраклеточных структур позволяет выявить характерные динамические изменения в формируемых экстраклеточных структурах в течение всего времени наблюдения.

Культивирование клеток проводили в следующих вариантах проб: 1) интактные нейтрофилы здоровых доноров; 2) нейтрофилы доноров с добавлением ЛПС; 3) нейтрофилы доноров и клетки аденокарциномы НСТ116; 4) нейтрофилы доноров с добавлением ЛПС и клетки аденокарциномы НСТ116; 5) нейтрофилы доноров и клетки миелобластомы K562; 6) нейтрофилы доноров с добавлением ЛПС и клетки миелобластомы K562.

Результаты совместного культивирования в разных комбинациях в течение 1 ч (табл. 1) свидетельствуют, что нейтрофилы здоровых доноров быстро реагируют на контактные взаимодействия с клетками аденокарциномы и формируют нейтрофильные сети. Однако реакция нейтрофилов в виде формирования нейтрофильных сетей на контакты с клетками миелобластомы K562 в течение 1 ч культивирования практически отсутствует. Характерной особенностью исследованных опухолевых клеток (НСТ116 и K562) является формирование ДНК-содержащих экстраклеточных структур значительных размеров. Клетки НСТ116 формируют одиночные нити длиной $54,92 \pm 6,82$ мкм, а клетки K562 – $99,00 \pm 8,41$ мкм. Выявленные различия между клетками НСТ116 и K562 при их контактах с нейтрофилами здоровых доноров состоят в том, что реакция нейтрофилов на взаимодействия с клетками K562 явно замедленная. В течение 1 ч совместного культивирования клеток K562 с нейтрофилами не происходит формирования нейтрофильных сетей – эта реакция проявляется позже.

Культивирование клеток НСТ116 с нейтрофилами в присутствии ЛПС существенно не изменяет параметры клеточных реакций (табл. 1). Не меняется ни количество ДНК-содержащих экстраклеточных структур ($8,87 \pm 1,20$ и $7,41 \pm 0,39\%$ соответственно), ни их размеры ($54,92 \pm 6,82$ и $53,92 \pm 6,06$ мкм соответственно).

Культивирование клеток K562 с нейтрофилами в присутствии ЛПС показывает резкое увеличение численности ДНК-содержащих экстраклеточных структур (табл. 1). Присутствие ЛПС в пробах с клетками K562 и нейтрофилами вызывает прирост количества нейтрофильных сетей (с $2,97 \pm 0,32$ до $10,70 \pm 1,81\%$), т.е. практически в 3 раза. При этом размеры ДНК-содержащих одиночных нитей из клеток K562 существенно (в 2 раза) уменьшаются

(с $99,00 \pm 8,41$ до $57,00 \pm 9,34$ мкм). Уменьшение размеров одиночных нитей из клеток K562, вероятно, связано с спонтанной ферментативной деградацией ДНК под действием ДНКаз, локализованных на самом хроматине, которые обладают свойством активироваться при деспирализации хроматина.

Через 2 ч культивирования (табл. 2) количество клеток, продуцирующих ДНК-содержащие структуры при совместном культивировании нейтрофилов и клеток НСТ116, составляет $6,47 \pm 0,46\%$. Причем наблюдается явное изменение морфологии ДНК-содержащих экстраклеточных структур, которые формируют клетки НСТ116. Происходит формирование пучков одиночных волокон, а количество НЭЛ, образующих сети, резко снижается (составляет не

более 10% от общего количества ДНК-содержащих экстраклеточных структур). Под влиянием ЛПС общее количество ДНК-содержащих экстраклеточных структур увеличивается до $10,75 \pm 0,84\%$ за счет прироста структур, продуцируемых нейтрофилами (нейтрофильные сети). Совместная инкубация нейтрофилов с клетками НСТ116 в присутствии ЛПС приводит к тому, что в пробах определяются нейтрофильные сети вместе с пучками ДНК-содержащих волокон клеток аденокарциномы. Присутствие ЛПС в пробах вызывает активацию нейтрофилов и формирование НЭЛ. Размеры пучков волокон, продуцируемых клетками НСТ116, при добавлении ЛПС практически не изменяются ($44,25 \pm 2,47$ и $46,67 \pm 5,54$ мкм соответственно, без ЛПС и в присутствии ЛПС).

Таблица 1

Параметры экстраклеточных структур при совместном культивировании в различных комбинациях нейтрофилов здоровых доноров, клеток аденокарциномы НСТ116 и миелобластомы K562 в течение 1 ч, $M \pm m$			
Исследуемые клетки	Количество экстраклеточных структур, %	Размеры экстраклеточных структур, мкм	Описание формирующихся экстраклеточных структур
Нейтрофилы (N)	0,00	0,00	Не формируют экстраклеточные структуры, сохраняют сегментоядерное строение
N + НСТ116	$8,87 \pm 1,20$	$54,92 \pm 6,82$	Нейтрофилы формируют сети, а клетки аденокарциномы НСТ116 одиночные нити
N + LPS	$4,69 \pm 0,29$	$32,25 \pm 2,60$	Нейтрофилы формируют сети
N + LPS + НСТ116	$7,41 \pm 0,39$	$53,92 \pm 6,06$	Сочетание нейтрофильных сетей с одиночными волокнами клеток аденокарциномы
N + K562	$2,97 \pm 0,32$	$99,00 \pm 8,41$	Нейтрофильные сети отсутствуют. Регистрируются только одиночные нити клеток миелобластомы K562
N + LPS + K562	$10,70 \pm 1,81^*$	$57,00 \pm 9,34^*$	Нейтрофильные сети в сочетании с одиночными нитями клеток миелобластомы K562

* $p < 0,05$ по сравнению с пробами без ЛПС здесь и в табл. 2, 3.

Таблица 2

Параметры экстраклеточных структур при совместном культивировании в различных комбинациях нейтрофилов здоровых доноров, клеток аденокарциномы НСТ116 и миелобластомы K562 в течение 2 ч, $M \pm m$			
Исследуемые клетки	Количество экстраклеточных структур, %	Размеры экстраклеточных структур, мкм	Описание формирующихся экстраклеточных структур
Нейтрофилы (N)	0,00	0,00	Не формируют экстраклеточные структуры, сохраняют сегментоядерное строение
N + НСТ116	$6,47 \pm 0,46$	$44,25 \pm 2,47$	Клетки аденокарциномы НСТ116 формируют пучки волокон
N + LPS	$23,65 \pm 2,35$	$39,67 \pm 2,81$	Нейтрофилы формируют сети
N + LPS + НСТ116	$10,75 \pm 0,84^*$	$46,67 \pm 5,54$	Сочетание нейтрофильных сетей с пучками волокон клеток аденокарциномы
N + K562	$8,25 \pm 0,59$	$21,58 \pm 2,80$	Нейтрофильные сети маленького размера
N + LPS + K562	$9,64 \pm 0,97$	$18,08 \pm 1,08$	Нейтрофильные сети маленького размера

Нейтрофилы, культивируемые с клетками K562 в течение 2 ч, формируют исключительно нейтрофильные сети численностью $8,25 \pm 0,59\%$, в присутствии ЛПС их количество составляет $9,64 \pm 0,97\%$, т.е. практически не изменяется (см. табл. 2). Клетки K562 в этот период наблюдений никакие ДНК-со-

держащие экстраклеточные структуры не формируют. Характерной особенностью клеток K562 является их способность подавлять активирующее влияние ЛПС на нейтрофилы, которое эти клетки должны получать через рецепторы врожденного иммунитета (TLRs). Вероятно, клетки линии K562 осуществля-

ют ингибирование активности нейтрофилов посредством гуморальных факторов. Размеры нейтрофильных сетей в присутствии клеток K562 небольшие и составляют $21,58 \pm 2,80$ мкм. В присутствии ЛПС было отмечено даже некоторое уменьшение размеров нейтрофильных сетей до $18,08 \pm 1,08$ мкм. Это

обстоятельство подтверждает ингибирующие влияния со стороны клеток K562, оказываемые на активированные нейтрофилы.

Результаты совместного культивирования опухолевых клеток с нейтрофилами здоровых доноров в течение 3 ч приведены в табл. 3.

Таблица 3

Параметры экстраклеточных структур при совместном культивировании в различных комбинациях нейтрофилов здоровых доноров, клеток аденокарциномы НСТ116 и миелобластомы K562 в течение 3 ч, $M \pm m$			
Исследуемые клетки	Количество экстраклеточных структур, %	Размеры экстраклеточных структур, мкм	Описание формирующихся экстраклеточных структур
Нейтрофилы (N)	0,00	0,00	Не формируют экстраклеточные структуры, сохраняют сегментоядерное строение
N + НСТ116	$20,13 \pm 1,71$	$135,92 \pm 12,43$	Клетки аденокарциномы НСТ116 формируют пучки волокон. Нейтрофильных сетей нет
N + LPS	$21,92 \pm 1,41$	$30,33 \pm 3,57$	Нейтрофилы формируют сети
N + LPS + НСТ116	$29,46 \pm 5,09$	>350	Пучки волокон клеток аденокарциномы. Нейтрофильных сетей нет
N + K562	$8,26 \pm 0,32$	$28,00 \pm 2,56$	Нейтрофильные сети маленького размера
N + LPS + K562	$14,82 \pm 1,27^*$	$25,08 \pm 2,62$	Нейтрофильные сети маленького размера

В этот период количество клеток, продуцирующих ДНК-содержащие структуры при совместном культивировании нейтрофилов и клеток НСТ116, составляет $20,13 \pm 1,71\%$, причем это исключительно ДНК-содержащие экстраклеточные структуры, которые продуцируют клетки аденокарциномы (рис.).

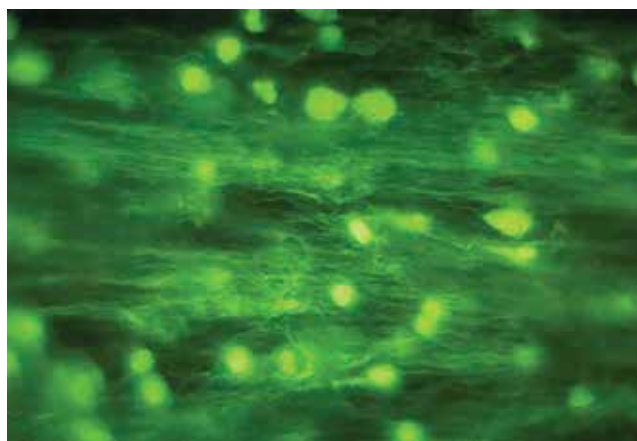


Рисунок. Клетки аденокарциномы НСТ116 спонтанно формируют пучки одиночных ДНК-содержащих нитей. Присутствующие в препарате нейтрофилы здорового донора нейтрофильные сети не формируют. Время инкубации 3 ч, окрашивание CYBR Green. $\times 1\,000$

Они представлены пучками ДНК-содержащих волокон, а НЭЛ при этом полностью отсутствуют. Количество ДНК-содержащих экстраклеточных структур в присутствии ЛПС увеличивается до $29,46 \pm 5,09\%$. Нейтрофилы здоровых доноров, культивируемые в течение 3 ч совместно с клетками НСТ116, прак-

тически не реагируют на активирующие влияния ЛПС. Добавление ЛПС в пробы не вызывает усиления формирования нейтрофильных сетей. Пучки волокон, происходящие из клеток аденокарциномы НСТ116 в этот период, имеют большую длину, превышающую 100 мкм ($135,92 \pm 12,43$). Под влиянием ЛПС длина волокон из клеток НСТ116 еще больше увеличивается (становится больше 350 мкм), что лежит за пределами измерительного диапазона.

В исследованиях на экспериментальных животных были получены данные о способности НЭЛ изменять метаболическую программу раковых клеток и за счет высвобождения нейтрофильных сетей способствовать росту раковых клеток [13]. Выявлена связь между образованием НЭЛ, частотой метастазирования, а также показателями выживаемости [14]. Необходимо отметить, что эти результаты [13, 14] получены косвенными методами. В исследованиях определяли не количество НЭЛ, а получали лишь признаки присутствия НЭЛ в организме экспериментальных животных и больных в виде растворимых факторов (нейтрофильной эластазы, миелопероксидазы, цитруллинированного гистона H3). Эти цитируемые результаты входят в некоторое противоречие с результатами нашего исследования *in vitro*, однако, необходимо отметить, что истинная морфологическая структура НЭЛ в организме онкологических больных еще не определена и этот вопрос всесторонне не исследован.

Нейтрофилы, культивируемые с клетками K562, формируют только НЭЛ численностью $8,26 \pm 0,32\%$, а под влиянием ЛПС их количество увеличивается

до $14,82 \pm 1,27$, при этом нитевидные структуры из клеток K562 через 3 ч инкубации уже не регистрируются (см. табл. 3). Возможно, одиночные ДНК-содержащие нити, происходящие из клеток миелобластомы, которые мы наблюдали при инкубации в течение 1 ч, подверглись спонтанной ферментативной деградации и поэтому не обнаруживаются в более поздних пробах. Размеры нейтрофильных сетей небольшие и не зависят от присутствия ЛПС в пробах. Так, без ЛПС размеры нейтрофильных сетей составляют $28,00 \pm 2,56$ мкм, а в присутствии ЛПС – $25,08 \pm 2,62$ мкм.

Результаты исследования совместного культивирования клеток линии K562 с нейтрофилами здоровых доноров в течение 3 ч свидетельствуют о возможном ингибирующем характере влияния со стороны клеток миелобластомы на процесс формирования нейтрофилами нейтрофильных сетей, имеющий защитный характер. Это наше предположение подтверждается другими данными исследователей, где определено, что K562, клеточная линия хронического миелоидного лейкоза, выделяет растворимый фактор (K562-IF) с низкой молекулярной массой (6–8 кДа), который подавляет функции нейтрофилов при воспалении [15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о способности нейтрофилов распознавать опухолевые клетки (НСТ116 и K562) и реагировать на контактные взаимодействия с ними, формируя нейтрофильные экстраклеточные ловушки в морфологической форме нейтрофильных сетей. Скорость развития реакции нейтрофилов, раскрывающих нейтрофильные сети, различная. Контакты с клетками аденокарциномы НСТ116 вызывают очень быстрое формирование нейтрофильных сетей – в течение 1 ч. Раскрытие нейтрофильных сетей, индуцированное контактами с клетками миелобластомы K562, требует более продолжительной инкубации – в течение 2 ч. Культивирование опухолевых клеток (НСТ116 и K562) в течение 3 ч демонстрирует способность этих клеток формировать ДНК-содержащие экстраклеточные структуры.

Клетки аденокарциномы НСТ116 формируют пучки ДНК-содержащих волокон значительного размера. Эти ДНК-содержащие волокна полностью ингибируют развитие нейтрофильных реакций в виде формирования нейтрофильных сетей. Данные наблюдения позволяют сделать заключение, что клетки опухолевой линии НСТ116 выключают защитные реакции системы врожденного иммунитета в форме раскрытия нейтрофильных сетей.

Клетки миелобластомы K562 подавляют нейтрофильные защитные реакции, уменьшая количество и размеры формирующихся нейтрофильных сетей. Эффект ингибирования нейтрофильных сетей со стороны клеток K562 обусловлен, вероятно, действием растворимого фактора, подавляющего функции нейтрофилов, описанного ранее.

Проведенное нами исследование показывает, что обе клеточные линии опухолевых клеток способны подавлять реакции клеток врожденного иммунитета с помощью различных механизмов. Клетки аденокарциномы ингибируют формирование нейтрофильных сетей при непосредственных контактах за счет продуцируемых ДНК-содержащих волокон значительного размера. Клетки миелобластомы вызывают тот же эффект действуя, вероятно, путем секреции гуморальных факторов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Masucci M.T., Minopoli M., Del Vecchio S., Carriero M.V. The emerging role of neutrophil extracellular traps (NETs) in tumor progression and metastasis. *Front. Immunol.* 2020;11:1749. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01749.
2. Rayes R.F., Mouhanna J.G., Nicolau I., Bourdeau F., Giannias B., Rousseau S. et al. Primary tumors induce neutrophil extracellular traps with targetable metastasis promoting effects. *JCI Insight.* 2019;5(16):e128008. DOI: 10.1172/jci.insight.128008.
3. Munir H., Jones J.O., Janowitz T., Hoffmann M., Euler M., Martins C.P. et al. Stromal-driven and Amyloid β -dependent induction of neutrophil extracellular traps modulates tumor growth. *Nature Communications.* 2021;12(1):683. DOI: 10.1038/s41467-021-20982-2.
4. Dzobo K. Taking a full snapshot of cancer biology: deciphering the tumor microenvironment for effective cancer therapy in the oncology clinic. *OMICS.* 2020;24(4):175–179. DOI: 10.1089/omi.2020.0019.
5. Khalaf K., Hana D., Chou J.T., Singh C., Mackiewicz A., Kaczmarek M. Aspects of the tumor microenvironment involved in immune resistance and drug resistance. *Front. Immunol.* 2021;12:656364. DOI: 10.3389/fimmu.2021.656364.
6. Balta E., Wabnitz G.H., Samstag Y. Hijacked immune cells in the tumor microenvironment: molecular mechanisms of immunosuppression and cues to improve t cell-based immunotherapy of solid tumors. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(11):5736. DOI: 10.3390/ijms22115736.
7. Gonzalez-Aparicio M., Alfaro C. Influence of interleukin-8 and neutrophil extracellular trap (NET) formation in the tumor microenvironment: is there a pathogenic role? *J. Immunol. Res.* 2019;2019:6252138. DOI: 10.1155/2019/6252138.
8. Mousset A., Bellone L., Gaggioli C., Albrengues J. NETscape or NEThance: tailoring anti-cancer therapy. *Trends Cancer.* 2024;10(7):655–667. DOI: 10.1016/j.trecan.2024.03.007.
9. Mousset A., Albrengues J. Neutrophil extracellular traps modulate chemotherapy efficacy and its adverse side effects. *Biol. Cell.* 2024;116(7):e2400031. DOI: 10.1111/boc.202400031.
10. Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Пани-

- на М.И., Рогожина Л.С., Ступин В.А. и др. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки при воспалительных заболеваниях брюшной полости. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2024;68(1):15–25. DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.15-25.
11. Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И., Ступин В.А., Ким А.Э. и др. Противомикробная защита организма человека с участием нейтрофильных сетей. *Бюллетень сибирской медицины*. 2024;23(1):56–63. DOI: 10.20538/1682-0363-2024-1-56-63.
 12. Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И. Новые возможности диагностики и исследования патогенеза различных видов воспаления. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2022;66(2):34–42. DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.34-42.
 13. Yazdani H.O., Roy E., Comerci A.J., van der Windt D.J., Zhang H., Huang H. et al. Neutrophil extracellular traps drive mitochondrial homeostasis in tumors to augment growth. *Cancer Research*. 2019;79(21):5626–5639. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0800.
 14. Wang W.W., Wu L., Lu W., Chen W., Yan W., Qi C. et al. Lipopolysaccharides increase the risk of colorectal cancer recurrence and metastasis due to the induction of neutrophil extracellular traps after curative resection. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2021;147(9):2609–2619. DOI: 10.1007/s00432-021-03682-8.
 15. Amar M., Amit N., Scoazec J.Y., Pasquier C., Babin-Chevaye C., Huu T.P. et al. K562 cells produce an anti-inflammatory factor that inhibits neutrophil functions *in vivo*. *Blood*. 1992;80(6):1546–1552.

Вклад авторов

Порядин Г.В., Салмаси Ж.М. – концепция и дизайн исследования. Казимирский А.Н., Ким А.Э., Чахалян А.Г., Турищева О.О. – экспериментальные исследования. Казимирский А.Н. – подготовка иллюстративного материала, написание текста статьи. Панина М.И. – статистическая обработка материала. Панина М.И., Салмаси Ж.М. – редактирование рукописи.

Информация об авторах

Казимирский Александр Николаевич – д-р биол. наук, доцент, профессор кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии, Институт биологии и патологии человека, вед. науч. сотрудник, отдел молекулярных технологий, НИИ трансляционной медицины, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, г. Москва, alnica10@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3079-4089>

Салмаси Жан Мустафаевич – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой патофизиологии и клинической патофизиологии, Институт биологии и патологии человека, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, г. Москва, profjms@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8524-0019>

Порядин Геннадий Васильевич – д-р мед. наук, чл.-корр. РАН, профессор кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии, Институт биологии и патологии человека, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, г. Москва, poryadin_GV@rsmu.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2010-3296>

Панина Марина Ивановна – д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии, Институт биологии и патологии человека, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, pan-mar@list.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7651-0037>

Ким Анна Эрнестовна – ст. преподаватель, кафедра патофизиологии и клинической патофизиологии, Институт биологии и патологии человека, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, г. Москва, infoany@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8119-772X>

Чахалян Анна Гендриховна – ассистент, кафедра патофизиологии и клинической патофизиологии, Институт биологии и патологии человека, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, г. Москва, Anna.ch97@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0001-1098-3560>

Турищева Ольга Олеговна – канд. мед. наук, доцент, кафедра патофизиологии и клинической патофизиологии, Институт биологии и патологии человека, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, г. Москва, turishevaolia@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0009-6000-9131>

(✉) **Казимирский Александр Николаевич**, alnica10@mail.ru

Поступила в редакцию 17.10.2024;
одобрена после рецензирования 27.10.2024;
принята к публикации 21.11.2024